

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12122 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06280		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1999 (26.08.99)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 198 39 113.7 27. August 1998 (27.08.98) DE 198 53 066.8 17. November 1998 (17.11.98) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (DE/DE); Hugstetter Strasse 49, D-79106 Freiburg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): SIMON, Jan [DE/DE]; Beckewaldstrasse 27a, D-79249 Merzhausen (DE). MARTIN, Stefan [DE/DE]; Kandelstrasse 8, D-79194 Gundelfingen (DE). TERMEER, Christian [DE/DE]; Jahnstrasse 9, D-79117 Freiburg (DE).			
(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).			
(54) Title: LOW-MOLECULAR FRAGMENTS OF HYALURONIC ACID FOR THE PREPARATION OF VACCINES			
(54) Bezeichnung: NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE DER HYALURONSÄURE ZUR HERSTELLUNG VON IMPFSTOFFEN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to the use of possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments for the preparation of vaccines. The vaccines are especially suitable for the treatment of cancer. Surprisingly it was found that possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments can be used both to produce mature dendritic cells and, together with antigens, peptides or carrier systems, directly as adjuvants in vaccines. Said possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments can also be coupled to an antigen, peptide or carrier system and this coupled system can advantageously be used as a vaccine, notably for the treatment of cancer.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung offenbart die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, zur Herstellung von Impfstoffen. Die Impfstoffe sind besonders geeignet zur Bekämpfung von Krebskrankungen. Überraschend wurde gefunden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, sowohl zur Herstellung von ausgereiften dendritischen Zellen verwendet werden können, als auch direkt mit Antigenen oder Peptiden oder Trägersystemen als Adjuvans in Impfstoffen eingesetzt werden können. Ebenfalls möglich ist eine Kopplung der niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, mit einem Antigen, Peptid oder Trägersystem. Das gekoppelte System kann dann vorteilhaft als Impfstoff, insbesondere zur Behandlung von Krebskrankungen, eingesetzt werden.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko		
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Niedermolekulare Fragmente der Hyaluronsäure zur Herstellung von Impfstoffen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von niedermolekularen Fragmenten der Hyaluronsäure in der Immuntherapie, insbesondere zur Herstellung von Zusammensetzungen, die in der Immuntherapie verwendet werden können. Solche Zusammensetzungen, die in der Immuntherapie einsetzbar sind, werden im Rahmen dieser Anmeldung allgemein als "Impfstoffe" bezeichnet.

Die Bereitstellung von dendritischen Zellen (DZ) erlangt bei der Therapie von verschiedenen Erkrankungen eine immer größer werdende Bedeutung. Mit Hilfe der dendritischen Zellen ist es möglich, hochaktive Immunmodulatoren bereitzustellen, die mit verschiedenen Antigenen, insbesondere Tumorantigenen, Viruspeptiden oder allergen wirkenden Verbindungen beladen werden können. Diese Zellen werden dann in der adoptiven Immuntherapie bei Patienten mit Tumoren, Viruserkrankungen oder Allergien eingesetzt. Es besteht daher in der adoptiven Immuntherapie ein erheblicher Bedarf an dendritischen Zellen, wobei diese dendritischen Zellen vorzugsweise über standardisierte, reproduzierbare und kostengünstige Verfahren

bereitgestellt werden sollen. Diese Verfahren müssen unter GMP-/GLP-Bedingungen durchgeführt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Erzeugung von dendritischen Zellen aus Stammzellen bekannt.

Aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) behandelten Chemotherapie-Patienten können hämatopoetische Stammzellen isoliert werden, die den Oberflächenmarker CD34 aufweisen. Diese Stammzellen werden unter Zugabe verschiedener Zytokine kultiviert und die dendritischen Zellen werden nach einer verhältnismäßig langen Kultivierungszeit erhalten.

Mittlerweile gibt es Verfahren, dendritische Zellen in großer Zahl in vitro aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes zu generieren (J. Immunol. Med. 1996, 196: 137-51; Exp. Hematology 1997, 25: 232-36; Ann. Surgery 1997, 226: 6-16).

Eine Studie an Melanompatienten unter Verwendung von nicht ausgereiften dendritischen Zellen des Standes der Technik zeigt Ansprechraten in 5 von 16 Patienten (Nature Medicine 1998, 4: 328-32), bei allen Patienten konnten aber T-Zellen mit Spezifität für das an dendritische Zellen gekoppelte Melanomantigen induziert werden. Es besteht jedoch das Problem, daß bei zu geringer Peptidmenge oder in Hinblick auf ihre Bindungsstärke modifizierten Peptiden eine Toleranz gegen das injizierte Peptid induziert werden kann (J. Immunol. 1998, 160: 4449-56). Im Hinblick auf eine Tumorthерапie wäre die Situation fatal, statt einer Immunisierung des Patienten würde diese Situation eine Tolerisierung gegenüber den induzierten Tumorantigenen bewirken. Untersuchungen der Erfinder zeigten, daß der Effekt auch nicht durch die Injektion einer größeren Menge von dendritischen Zellen zu umgehen ist. Vielmehr ist für einen erfolgversprechenden Einsatz von dendritischen Zellen der

Grad ihrer Aktivierung bzw. Ausreifung ("Maturation") entscheidend.

Ein Verfahren zur Ausreifung von dendritischen Zellen unter Einsatz von Monocyte Conditioned Medium (MCM), Tumor necrosis factor alpha (TNF α) oder CD40-Ligation ist im Stand der Technik bekannt (J. Immunol. Methods 1996, 196: 121-135; J. Exp. Med. 1997, 185: 341-349; Blood 1998, 91: 4652-4661). Bei diesen Verfahren werden Monozyten aus peripherem Blut isoliert, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden. Zur vollständigen Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen müssen am Ende der Differenzierungsphase weitere Zytokine zugesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen aber verschiedene Nachteile auf. Die verhältnismäßig lange Kultivierungsdauer ist für den Einsatz in der Klinik nicht geeignet. Darüber hinaus können die hohen Kosten der Zytokine und die Chargenabhängigkeit der eingesetzten Zytokine nachteilig sein.

Bei herkömmlichen Vaccinierungen mit Antigenen oder Peptiden besteht auch ein Problem dahingehend, daß häufig die Immunantwort zu schwach ist bzw. daß, wie vorstehend erwähnt, die Herstellung von ausgereiften dendritischen Zellen, die eine verbesserte Immunantwort bewirken könnten, zu aufwendig, zu kostspielig und nicht reproduzierbar genug ist. Bei der Vaccinierung von Tumorpatienten hat sich darüberhinaus gezeigt, daß sich mit einer lokalen Antigeninjektion zwar Immunantworten auslösen lassen, diese jedoch weitgehend auf die injizierte Extremität oder sogar nur die nächste Lymphknotenstation beschränkt bleiben. Es besteht daher auch ein Bedürfnis nach einer Vaccinierungsstrategie, insbesondere für Tumorpatienten, bei denen das Antigen auch systemisch gegeben werden kann, um so eine generalisierte Immunantwort zu induzieren. Die naheliegendste Lösung dieses Problems, nämlich die Verabreichung einer intravenösen Gabe von Peptid und einem

geeigneten Adjuvans, weist den Nachteil auf, daß durch den Verdünnungseffekt im peripheren Blut das Adjuvans innerhalb kürzester Zeit unwirksam wird.

Diese Probleme können aufgrund des überraschenden Befunds gelöst werden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente vorteilhaft auf verschiedene Art und Weise in der Immuntherapie, insbesondere zur Vaccinierung von Tumorpatienten, eingesetzt werden können.

Die vorliegende Erfindung stellt daher allgemein die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können, zur Herstellung eines Impfstoffes, insbesondere zur Vaccinierung durch subkutane (s.c.), intrakutane (i.c.) und intravenöse (i.v.) Vaccinierung, insbesondere zur Behandlung von Tumorpatienten zur Verfügung.

In einer ersten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen zur Verfügung, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononukleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Impfstoffe, die die entsprechend ausgereiften dendritischen Zellen enthalten, sowie die Verwendung der mit Hyaluronsäurefragmenten ausgereiften dendritischen Zellen zur Herstellung solcher Impfstoffe.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Impfstoffe, die niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, als Adjuvans enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Systeme, die ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und daran gekoppelt ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthalten. In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Impfstoffe, die ein derartig mit einem Hyaluronsäurefragment modifiziertes Antigen oder Peptid enthalten.

Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Impfstoffe zur subkutanen (s.c.), intrakutanen (i.c.) oder intravenösen (i.v.) Vaccinierung insbesondere von Tumorpatienten verwendet.

Zunächst wird im folgenden die erste Ausführungsform der Erfindung, nämlich das Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, beschrieben, sowie die entsprechenden Impfstoffe, die diese ausgereiften dendritischen Zellen enthalten.

Mononukleäre Zellen können aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten gewonnen werden, wobei in bevorzugter Ausführungsform ein Leukozytenkonzentrat über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgetrennt wird.

In dem zweiten Verfahrensschritt werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen angereichert,

bevorzugt mit Hilfe von wenigstens einem gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper. Zum Einsatz kommen können hier die Magnet-aktivierte Zell-Sortierung (MACS) oder die Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS). Eine einfachere, jedoch nicht so effiziente Methode stellt die Anreicherung über Plastikadhäsion dar.

Anschließend werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist. Gegebenenfalls können noch weitere geeignete Zytokine zugesetzt werden.

Schließlich werden die in dem Kultivierungsschritt erhaltenen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, wobei diese Fragmente 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen. Ein Grundbaustein stellt ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung dar. Bevorzugt eingesetzt werden Hyaluronsäurefragmente mit jeweils 1 bis 10 Grundbausteinen.

Die Kultivierung der den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen erfolgt in einem Medium, das GM-CSF und IL-4 enthält, bevorzugt für eine Dauer von wenigstens 72 h bis 7 Tagen. Hieran schließt sich die Kultivierung in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten an. Die Hyaluronsäurefragmente liegen bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 50 μ g/ml und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 30 μ g/ml vor.

Die vorliegende Erfindung betrifft also in einer Ausführungsform die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten für die Ausreifung von dendritischen Zellen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können dendritische Zellen hergestellt bzw. angereichert werden. Die dendritischen Zellen sind Antigen präsentierende Zellen, die auf die Initiation der primären Immunantwort spezialisiert sind. In den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung übernehmen sie unterschiedliche Funktionen. In dem unreifen Zustand sind die dendritischen Zellen sehr effektiv beim Prozessieren von nativen Protein-Antigenen für den MHC Klasse II-Weg. Reife dendritische Zellen sind dagegen weniger für die Aufnahme von neuen Proteinen für die Präsentation geeignet, stimulieren aber dafür viel besser die ruhenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung.

In vivo läuft die Reifung der dendritischen Zellen dann ab, wenn die unreifen dendritischen Zellen von den Stellen der Antigenaufnahme zu den T-Zell-Bereichen der lymphoiden Organe wandern. In vitro kann die Reifung in Kulturen von frisch isolierten dendritischen Zellen beobachtet werden. Die Reifung der dendritischen Zellen schlägt sich auch in Änderungen der Morphologie und des Phänotyps nieder. Die Charakterisierung und Differenzierung der dendritischen Zellen erfolgt üblicherweise über den Nachweis verschiedener Oberflächenmarker.

Aufgrund der natürlichen Funktionen sind die dendritischen Zellen besonders geeignet, als natürliches Adjuvans bei der Impfung und Immuntherapie, insbesondere bei der Tumortherapie, eingesetzt zu werden. Dabei ist es für den angestrebten therapeutischen Einsatz entscheidend, ausgereifte DZ's zu verwenden, die sich nach Reinfusion in den Patienten nicht wieder zu Makrophagen-ähnlichen Vorstadien zurückdifferenzieren können.

Man geht nach derzeitigem Wissensstand davon aus, daß die dendritischen Zellen im unreifen Zustand das Antigen (beispielsweise ein Tumorantigen) aufnehmen und anschließend das Antigen prozessieren. Dabei reifen die dendritischen Zellen

und wandern zu den T-Zell-reichen Bereichen der sekundären lymphoiden Organe. Reife dendritische Zellen exprimieren in hohem Maße MHC, co-stimulierende Moleküle und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, wodurch eine Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen ermöglicht wird (T-cell clustering). Co-stimulatorische Signale werden über B7-CD28 und CD40-CD40-Liganden-Interaktionen übertragen und durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- α , IFN- γ und IL-12, die bekannterweise die zellulär vermittelte Immunität fördern, verstärkt.

Nach derzeitigem Wissensstand scheint es wesentlich zu sein, daß für die Induktion von primärer T-Zellantwort spezialisierte Antigen präsentierende Zellen vorhanden sind, da die Präsentation von Antigenen an T-Zellen in Abwesenheit eines zweiten Signals (Co-Stimulation) entweder das Absterben der T-Zellen oder eine Antigen-spezifische Toleranz bewirken kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind daher insbesondere darin zu sehen, daß die dendritischen Zellen relativ einfach bereitgestellt werden können. Außerdem müssen nur verhältnismäßig geringe Konzentrationen an kostspieligen Zytokinen eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bereitstellung einer Zellpopulation, die ganz überwiegend aus dendritischen Zellen besteht und, die sich in einem verhältnismäßig einheitlichen (synchronen) Reifungszustand befinden. Wenn die dendritischen Zellen für die Präsentation von Antigenen eingesetzt werden sollen, können die geeigneten Antigene zu einem geeigneten Zeitpunkt zu den dendritischen Zellen zugegeben werden und die Antigene können dann von den dendritischen Zellen im Laufe des Reifungsprozesses prozessiert werden. Die Antigene können entweder als Proteine, in Form von abgetöteten Zellen oder Zellpräparationen oder auch in Form von gentechnologisch modifizierten Zellen zugegeben werden. Wenn sich die

dendritischen Zellen in dem gewünschten Zustand befinden, können sie für die Therapie verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Bereitstellung von autologen dendritischen Zellen geeignet. Der Begriff "autolog" bedeutet, daß die Ausgangszellen einem Spender (Patienten) entnommen werden. Diese Zellen werden dann *in vitro* erfindungsgemäß behandelt, um dendritische Zellen zu gewinnen. Die angereicherten dendritischen Zellen werden dann gegebenenfalls nach Kontakt mit dem Antigen demselben Spender, von dem sie ursprünglich herstammen, zurückgegeben.

Alternativ hierzu kann das Verfahren auch für die Bereitstellung von "allogen" dendritischen Zellen verwendet werden. Hierbei werden die Zellen von einem Spender oder auch aus Blutkonserven, die von Blutspendediensten erhalten werden können, hergestellt und dann an andere Empfänger zurückgegeben. Hierdurch können standardisierte dendritische Zellen bereitgestellt werden, die beispielsweise optimal mit einem Tumorantigen beladen sind. Insbesondere bei viralen Infektionen (HIV) kann so die zelluläre Immunität effektiv gesteigert werden.

Erfindungsgemäß werden zur Ausreifung der dendritischen Zellen Fragmente von Hyaluronsäure (HA), die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, eingesetzt. Die Hyaluronsäure ist ein makromolekulares Polysaccharid, das als körpereigene Substanz vor allem in der Dermis zur Wasserspeicherung dient. Hyaluronsäure wird vor allem von Keratinozyten in den basalen Schichten der Oberhaut (Epidermis) sowie von Fibroblasten des Unterhaut-Bindegewebes produziert. Hyaluronsäure findet sich auch im Glaskörper von Augen, der Synovialflüssigkeit der Gelenke und ist ein Bestandteil des Bindegewebes. Bei niedrigen Konzentrationen bildet Hyaluronsäure eine hochviskose wässrige Lösung. Die Hyaluronsäure ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50000 Dalton und mehreren

Millionen Dalton. Der Grundbaustein der Hyaluronsäure ist ein Aminodisaccharid, das aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung besteht. Dieser Grundbaustein ist mit der nächsten Einheit β 1-4-glycosidisch verbunden. Diese unverzweigte Kette der Hyaluronsäure besteht aus etwa 2000 bis 10000 derartiger Grundeinheiten. Durch Hyaluronidasen werden β -glucosidische Bindungen hydrolysiert und die Hyaluronsäure wird so zu kleineren Bruchstücken abgebaut. Erfindungsgemäß werden bevorzugt die Hyaluronidase aus Bullenhoden oder die aus *Streptococcus hyaluronicus* isolierte Hyaluronidase verwendet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Hyaluronsäurefragmente werden bevorzugt zunächst mechanisch durch Scherkraft und/oder Ultraschall zerkleinert und anschließend erfolgt ein weiterer Abbau des Polysaccharids mit Hilfe einer geeigneten Hyaluronidase. Die gewünschten Fragmente mit bevorzugt 1 bis 50 Grundeinheiten werden anschließend durch geeignete Trennverfahren isoliert.

Die Hyaluronsäurefragmente können vor oder nach der Isolierung geeignet chemisch modifiziert werden. Eine Modifizierung nach der Isolierung ist bevorzugt. Als Modifikationen können beispielsweise Veresterung, Salzbildung, Amidierung, Reduktion einer Säuregruppe zum Aldehyden oder Alkohol oder Abspaltung einer Säuregruppe genannt werden. Bevorzugt sind Salze und Ester der Hyaluronsäurefragmente, beispielsweise Alkali- und Erdalkalisalze und C₁-C₁₀-, bevorzugt C₁-C₄-Alkylester. Auch andere chemische Modifikationen sind möglich und von einem Fachmann aufgrund seines Fachwissens ohne weiteres durchführbar.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgend beschriebenen Beispiele weiter erläutert. Bei der Durchführung der Beispiele wurde besonders auf Verunreinigungen der Reagenzien mit Lipopolysacchariden (LPS) geachtet. Lipopolysaccharide sind Bestandteile aus der Zellwand Gramm-

negativer Bakterien. Schon kleinste Verunreinigungen mit Lipopolysacchariden reichen aus, um Monozyten bzw. CD14⁺-Stammzellen des peripheren Blutes irreversibel zu aktivieren. Daher wurde bei den erfundungsgemäß durchgeführten Versuchen darauf geachtet, einen Schwellenwert von 0,01 ng/ml Lipopolysaccharid zu unterschreiten, der erfahrungsgemäß keinen Einfluß auf Monozyten, CD14⁺ Stammzellen oder dendritische Zellen hat.

Beispiel 1: Zellisolation

a) Gewinnung von mononukleären Zellen (PBMC)

Ein Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) von einem gesunden, humanen Spender wurde über einem Dichtegradienten mit Ficoll-Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durch Zentrifugation aufgetrennt. Die mononukleären Zellen (PBMC) lagern sich dabei in der Interphase des Gradienten ab, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sowie neutrophile Granulozyten befinden sich unter dem Gradienten und wurden verworfen. Ficoll-Hyperpaque plus ist ein Gemisch von makromolaren Zuckern zellulärer Herkunft, ist aber vom Hersteller auf den LPS-Gehalt getestet (Endotoxin-Gehalt >0,001 ng/ml). Dieser Wert konnte in eigenen Tests bestätigt werden.

b) Markierung der CD14-positiven Zellen

Zur weiteren Aufreinigung der Monozyten wurden die PBMC für 45 min. mit anti-CD 14-mAK inkubiert. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. MACS® (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = Magnetic activated Cell sorting; Eine Methode zur Aufreinigung von Zellen über an Metallkügelchen gebundene Antikörper; Markierte Zellen bleiben in der magnetischen Säulenmatrix hängen. [PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco) mit 5 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) und Rinder-Serumalbumin (BSA); pH 7,2 durch Zugabe von

HCl eingestellt]. Durch Zugabe von EDTA wird das Klumpen der Zellen verhindert, was wichtig für die Aufreinigung in der Säule ist. Nun wurden die Zellen mit 50 µl Ziege-anti-Maus-IgG Microbeads unter den gleichen Bedingungen inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

c) Anreicherung der CD14-positiven Zellen über MACS

Die Anreicherung erfolgte bei 4°C. Die VS+®Säule wurde in den MACS-Magneten (beides Miltenyi) eingesetzt und zunächst mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen durch ein Zellsieb (30 µm Maschenweite; Miltenyi) passiert und auf die Säule aufgetragen. Die Negativfraktion aus unmarkierten Zellen, die magnetisch nicht in der Säulenmatrix festgehalten wurden, liefen durch und wurden verworfen. Die Säule wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um eine möglichst reine Positivfraktion zu erhalten. Anschließend wurde die Säule aus den Magneten genommen und die spezifisch über Microbeads in der Matrix festgehaltenen Zellen unter Druck mit 5 ml Puffer in ein steriles Röhrchen gespült. Die erhaltenen Zellen wurden in der Neubauerkammer ausgezählt. In der Regel konnten durch diese Methode aus einem Buffy-coat $3-5 \times 10^7$ CD14-positive Zellen (Monozyten) gewonnen werden, mit einer Reinheit >90 %. Diese Zellen lassen sich vollständig durch Zytokinzugabe in DZ umwandeln.

Beispiel 2: Zellkultur

Die isolierten CD14-positiven Zellen wurden in 12 ml c-RPMI [(cRPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Schottland) mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin), alle Bestandteile enthalten weniger als 0,025 internationale Endotoxineinheiten/ml (Richtwert für Aqua ad injectabilia)] aufgenommen. Um sie zu dendritischen

zellen (DCs) ausreifen zu lassen, wurde ihnen humanes GM-CSF für die klinische Anwendung (Leukomax 400®, Sandoz AG, Nürnberg) in einer Konzentration von 8000 Einheiten/ml Medium und IL-4 (Genzyme, Rüsselsheim, Charge auf LPS-Gehalt getestet: <0,001 ng/ml) in einer Konzentration von 500 Einheiten/ml Medium zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension in einer Six-Well-Platte zu jeweils 2 ml auspipettiert und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am vierten Tag wurden nochmals 2 ml/well c-RPMI mit GM-CSF und IL-4 dazugegeben.

Beispiel 3: Hyaluronsäurepräparationen

a) Fraktionierung von Hyaluronsäure und Auftrennung der Fragmente

Aufgereinigte Hyaluronsäure (HA) aus Hahnenkämmen (Healon®; Pharmacia, für den klinischen Einsatz bestimmt, Endotoxin-Gehalt >0,001 ng/mg) wurde zunächst mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier) für 2 min. in größere Bruchstücke gespalten. Um diese Bruchstücke weiter zu zerkleinern, wurde ihnen Hyaluronidase (Typ I aus Rinderhoden; Sigma) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Natriumacetat auf pH 5 eingestellt, bei 37°C für 12 Std. inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 90°C inaktiviert. Die erhaltenen Fragmente wurden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden sie in einer 1,5 m langen Glassäule auf ein Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-10, Bio-Rad, München) geschichtet. Als Spülflüssigkeit diente Aqua bidestillata, unter der Säule nahm ein Fraktionssammler (Pharmacia) alle 20 min. die Fraktionen auf. Die Röhrchen wurden verschlossen, kühl und lichtgeschützt gelagert.

b) Detektion der Größe der Hyaluronsäurefragmente

1. *größere Bruchstücke nach Ultraschallzerkleinerung*

Sonifizierte HA wurde in einem 5 %igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Polysaccharidbanden wurden im Gel durch Färbung mit Stains-all (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbo-cyanin; Sigma) sichtbar gemacht. Die so erhaltenen Fragmente haben eine Größe von 10.000 bis 50.000 kDa.

2. *kleine Fragmente nach zusätzlicher Hyaluronidaseverdauung*

ANTS-Markierung:

Zunächst mußten die einzelnen Proben mit dem Fluorophor ANTS markiert werden [ANTS-Lösung: 0,15 M 8-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonsäure Dinatriumsalz in Essigsäure/Wasser (3/17, v/v), durch langsames Erhitzen auf 60°C gelöst]. ANTS markiert jedes Zuckermolekül am Kettenende. Die kleinen Fragmente wurden ebenfalls mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 30 % Acrylamidgels aufgetrennt. Das Gel konnte nun unter UV-Licht (ANTS-Farbstoff) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

c) Quantitative Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration nach der Fragmentierung und Auftrennung

Es wurden von jeder Probe 0,1 ml abgenommen und im Eisbad mit 0,6 ml Färbelösung (5,2 g di-Natrium-Tetraborat in 1 l konzentrierter Schwefelsäure) gemischt. Nun wurden jeweils 0,02 ml 0,1 % Carbazol in Ethanol zugegeben, gemischt und abermals 10 min. lang gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur konnte die HA-Konzentration photometrisch bei 520 nm bestimmt werden. Als Leerwert diente Aqua dest., als Standard 0,2 µM HA/ml in Aqua dest.

Beispiel 4: Zellstimulation

Zur Stimulation wurden den Zellen am vierten Tag der Kultivierung unterschiedliche HA-Fragmente in einer Konzentration von 0,025 mg/ml (25 µg/ml) Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten Lipopolysaccharide (LPS) von Escherichia coli Serotyp 0177 (Sigma).

Ergebnisse:

- 1) Auftrennung der erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese und ANTES-Färbung. Die erfindungsgemäß verwendeten Fragmente weisen eine Größe von 2 bis hin zu 12-fach-Zuckern auf. Die Konzentrationsmessung ergab Werte von etwa 1 mg/ml gespaltenes HA. Eine weitere Aufspaltung dieser Fraktion in einzelne Zucker ist prinzipiell mittels einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) möglich. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß besonders die kleinen Fragmente für die Stimulation verantwortlich sind.
- 2) Einfluß der DC-Stimulierung mittels HA-Fragmenten auf die Expression von Oberflächenmarkern.

Über die FACS Abbildungen kann die Oberflächendichte verschiedener Rezeptoren mittels Antikörper festgestellt werden. Integriert man die Fläche unter den Kurven, erhält man die sogenannte MFI (Mean fluorescence intensity). Diese Werte sind in der Tabelle 1 für verschiedene Rezeptoren aufgelistet.

Tabelle 1

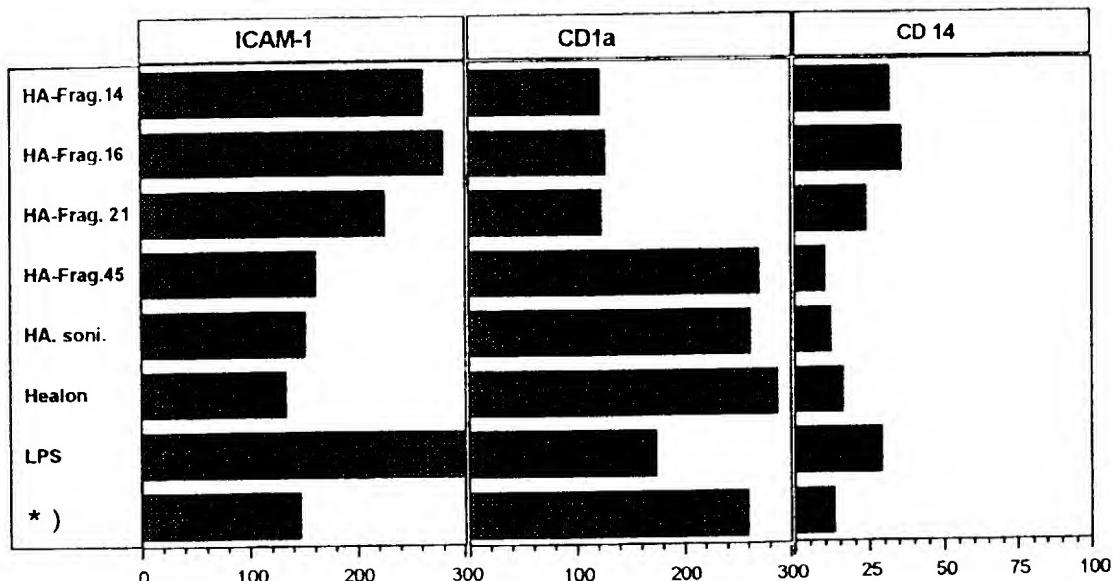
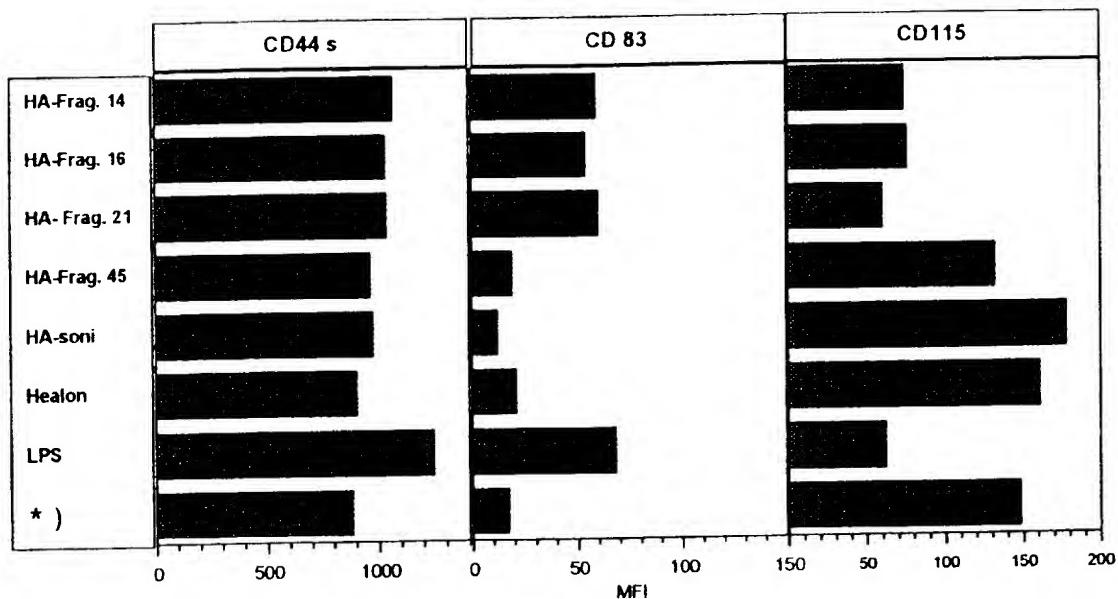


Tabelle 1 *) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Zur Bedeutung der einzelnen, in Tabelle 1 aufgeführten Oberflächenmarker:

ICAM-1 ist ein fast ubiquitär vorkommendes InterCelluläres AdhäsionsMolekül. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Aufregulation, wie sie bei verschiedensten Arten der Zellaktivierung beobachtet wird. CD1a ist ein Marker für dendritische und Langerhanszellen der Haut; während Monozyten ausschließlich CD14 exprimieren, kommt es im Laufe der Ausreifung immer mehr zum Verlust von CD14 und Expression von CD1a. LPS, HA-Fragmente und MCM-Medium drängen diesen Prozeß wieder leicht zurück, funktionelle Konsequenzen dieser Regulation sind aber nicht bekannt.

Tabelle 2:

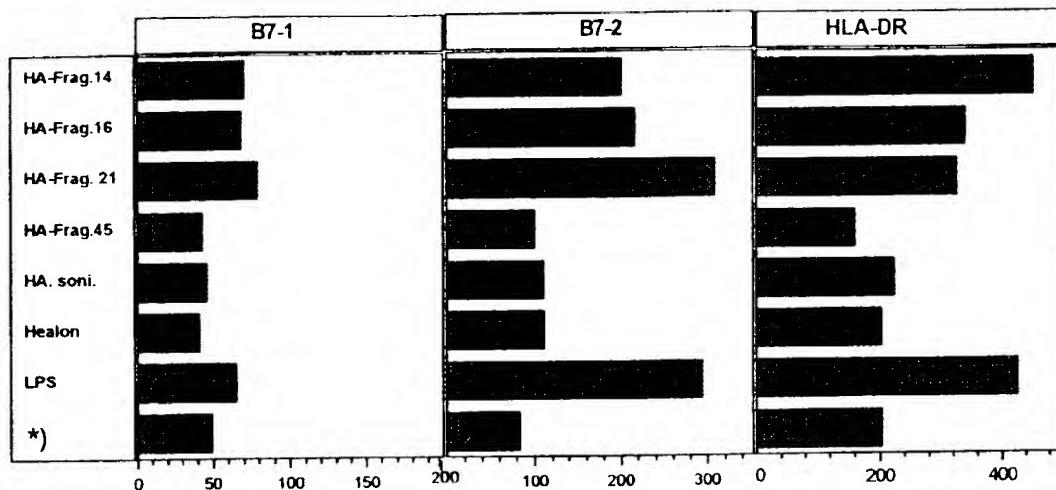


*) un behandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 2 zeigt die Stimulierung anderer Oberflächenmarker (CD44s, CD83 und CD115). Weiteres Anzeichen der DZ-Ausreifung sind eine Herunterregulation von CD115 (dem G-CSF Rezeptor) sowie eine Aufregulation von CD83, eine funktionelle Relevanz dieser Veränderungen ist noch nicht bekannt. In der Tabelle 2 ist deutlich zu sehen, daß die Kriterien der DZ-Ausreifung durch Stimulation mit kleinen HA-Fragmenten voll erfüllt werden.

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, eine beschriebene Funktion ist die Bindung von HA.

Tabelle 3



*) un behandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 3 zeigt die Expression von weiteren Oberflächenmarkern.

Neben den Reifungsmarkern sind hier Faktoren dargestellt, die für die Funktion der Antigen Präsentation, d.h. der Stimulation von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen. Hierzu zählen das MHC Klasse II Molekül HLA-DR sowie die beiden kostimulatorischen Faktoren B7-1 und B7-2. Ohne die Aufregulation dieser Faktoren ist auch ein Einsatz der DZ in den oben beschriebenen Anwendungen nicht sinnvoll. Erfindungsgemäß wurde eine deutliche Aufregulation aller Faktoren nach Behandlung mit HA-Fragmenten gefunden, vergleichbar mit der maximalen Stimulation nach LPS-Gabe.

Beispiel 5

Um die vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen funktionell darzustellen, wurden die DZ vorstimuliert und für 5 Tage mit aufgereinigten naiven allogenen T-Zellen inkubiert, die ebenfalls aus Leukozytenkonzentrat (buffy coats) gewonnen wurden (sog. mixed leukocyte reaction, MLR). Je nach

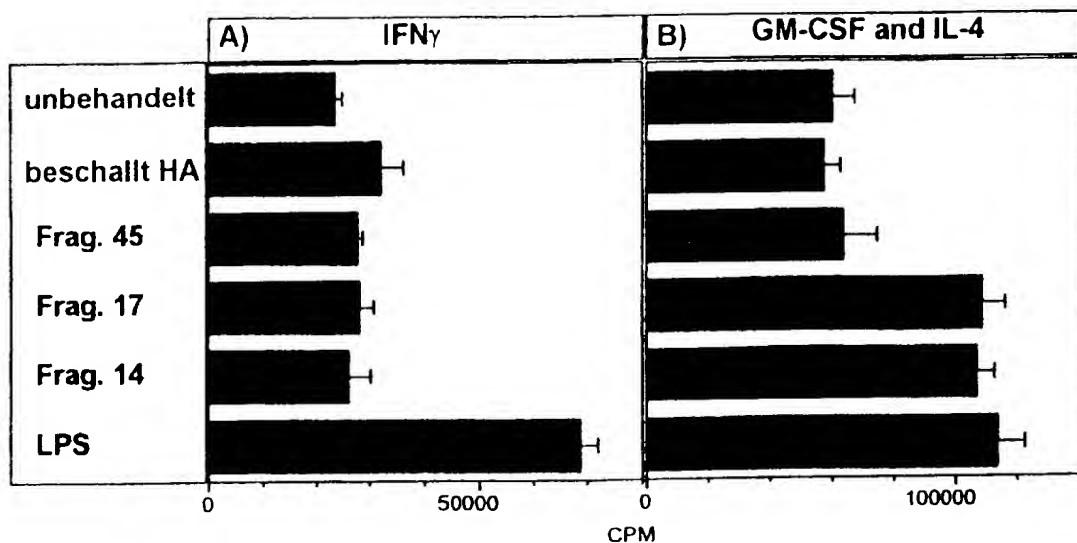
stimulatorischer Kapazität der DZ's kommt es dabei zu mehr oder weniger ausgeprägter T-Zellproliferation, die mittels Einbau von radioaktiven ^3H -Thymidin bestimmt wurde. Es wurden die radioaktiven Counts per minute (Cpm) der einzelnen Proben dargestellt, die direkt mit der stattgefundenen T-Zellproliferation korrelieren. Man sieht, daß DZ's, die mit kleinen HA-Fragmenten behandelt wurden, deutlich potentere APC's sind, vergleichbar mit dem für LPS-Stimulation erhaltenen Wert (dargestellt in Tabelle 4 B).

Auch dieses Beispiel belegt, daß erfindungsgemäß mit kleinen HA-Fragmenten zwischen 2-12 UDP-Zuckermolekülen eine deutliche Ausreifung von DC erhalten wird, die durchaus vergleichbar ist mit publizierten Daten anderer Methoden. Eine strenge Abhängigkeit von einem einzelnen Zucker erscheint unwahrscheinlich, jedoch haben größere Moleküle (20-30 UDP-Zucker) offensichtlich keinen Einfluß, da die erfindungsgemäß eingesetzten Fraktionen keine Unterschiede in der Wirkung zeigen, auch wenn sie größere Fragmente enthalten. Geschallte HA hat ebenfalls keinen Effekt.

Beispiel 6

Interessanterweise ist der erfindungsgemäße Effekt offensichtlich spezifisch für DZ's, da mit Interferon-gamma (IFN γ) behandelte Monozyten, die zu Makrophagen ausreifen, keine Steigerung ihrer stimulatorischen Kapazität nach Behandlung mit HA-Fragmenten zeigen (siehe Tabelle 4 A).

Tabelle 4



Frag. 45: In der Gelelektrophorese kein Nachweis von kleinen HA-Fragmenten, im Uronsäure-Assay weniger als 0,001 mg HA = Negativfraktion zum Ausschluß einer Wirkung von Säulenbestandteilen.

Frag. 17: In der Gelelektrophorese liegen die größten nachweisbaren Banden bei ca. 16-fach Zuckern, stark vertreten sind Zucker bis zu einer Größe von 6-fach Zucker.
Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Frag. 14: Gelelektrophorese: bis ca. 22-fach Zucker, starke Banden bis 10-fach Zucker, Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Beispiel 7

In diesem Beispiel wird gezeigt, daß überraschenderweise durch niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente ausgereifte dendritische Zellen herkömmlichen dendritischen Zellen in der

Induktion einer peptidvermittelten Hapten spezifischen Immunität überlegen sind.

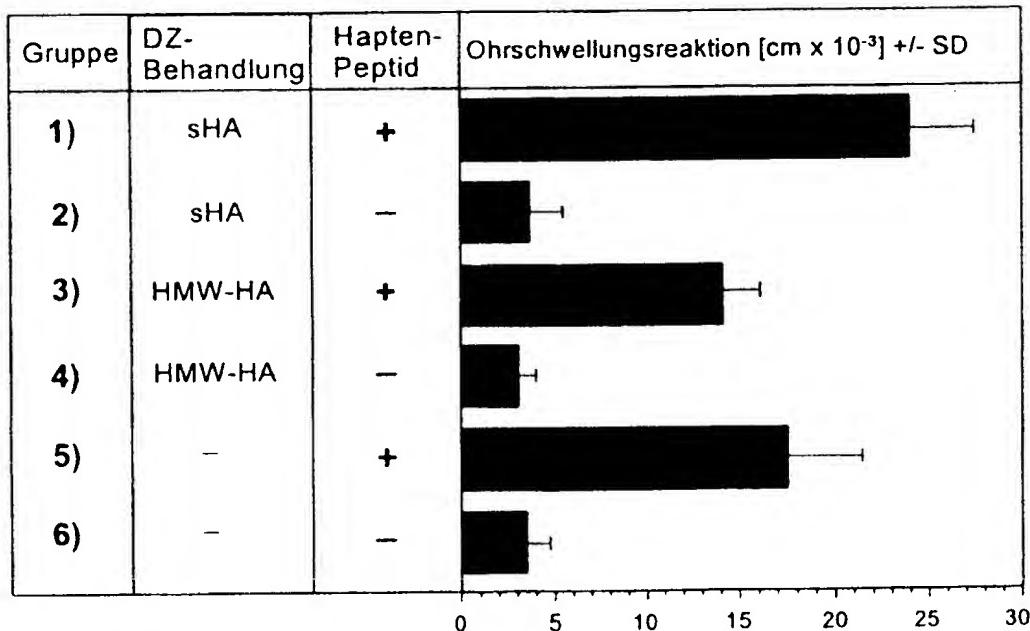
Mäusen (C57/BL6, weiblich, 6-12 Wochen, 60 Stück, 5 Mäuse pro experimentelle Gruppe, 20 g pro Maus) wurden dendritische Zellen injiziert, die zuvor mit einem synthetisch hergestellten Protein mit definierter Aminosäure-Sequenz, einem Peptid (SIINFEK*L, SIIK*FEKL; * = TNP-Lysin), behandelt wurden. Das Peptid ist so gewählt, daß es direkt mit der Antigenbindungsstelle von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Antigen Präsentierenden Zellen reagieren kann; das heißt, es wird unmittelbar nach der Zugabe von dendritischen Zellen auf ihrer Oberfläche präsentiert. An dieses Peptid wiederum ist das Hapten Trinitrophenyl (TNP) gekoppelt, das die antigene Determinante darstellt. Das heißt, eine T-Zelle, die über das von der dendritischen Zelle präsentierte an Trinitrophenyl gekoppelte Peptid aktiviert wird, wird reaktiv gegen Trinitrophenyl bzw. chemische Strukturhomologe des Trinitrophenyl, wie z.B. das während der weiter unten ausgeführten Auslösungsphase (Challenge) verwendete Trinitro-Chlorobenzen (TNCB). Die Stärke der Trinitrophenyl-spezifischen T-Zellreaktion richtet sich in diesem System dementsprechend nach dem Grad der dendritischen Zellaktivierung; bzw. der Effektivität mit der das an Trinitrophenyl gekoppelte Peptid von den dendritischen Zellen den T-Zellen präsentiert wird. Die Methode stellt ein anerkanntes Modell zur in vivo Untersuchung von Mechanismen dar, die während der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen.

Entsprechende Verfahren sind beispielsweise in den Druckschriften J. Invest. Dermatol. 1998, 110: 441-48; Eur. J. Immunol. 1995, 25: 92-101 und J. Immunol. 1993, 151: 678-87 genauer beschrieben.

Die injizierten dendritischen Zellen lösen innerhalb einer Woche eine T-Zell vermittelte Immunantwort aus. Das heißt, sie

migrieren nach der Injektion in die lymphatischen Organe und lösen dort die oben beschriebene T-Zellaktivierung aus. Die Effizienz der erfolgten Immunisierung kann nach dieser Zeit anhand einer Ohrschwellungsreaktion, die durch direkte Applikation (Ohrpinselung mit einer 1%igen TNBCB-Lösung) eines Trinitrophenyl-Analogons, in unserem Fall Trinitro-Chlorobenzen (TNBCB), auf das Ohr quantifiziert werden. Diese Behandlung löst innerhalb von 24h eine Entzündungsreaktion aus, deren Stärke von der Anzahl der in der Haut liegenden Memory T-Zellen abhängt. Die Ohrschwellungsreaktion wird in als Dichtenzunahme des Ohres in μm gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5



In diesem System konnte eine deutliche Steigerung der Ohrschwellungsreaktion nach Vorbehandlung der dendritischen Zellen mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten nachgewiesen werden. Die Injektion von unbehandelten

dendritischen Zellen (Gruppe 6) löst eine kaum nachweisbare Ohrschwellungsreaktion aus, ebenso wie die alleinige Vorbehandlung mit hochmolekularer Hyaluronsäure (Gruppe 4) oder niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten (Gruppe 2). Werden die dendritischen Zellen mit Hapten-Peptid vorbehandelt (Gruppe 5), ergibt sich eine deutliche Ohrschwellungsreaktion von ca. 0,15 mm. Die T-Zellantwort lässt sich durch zusätzliche Vorbehandlung der dendritischen Zellen mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten signifikant verbessern und zeigt eine Ohrschwellungsreaktion von ca. 0,24 mm (Gruppe 1). Eine Vorbehandlung mit hochmolekularer Hyaluronsäure und Hapten-Peptid dagegen (Gruppe 3) zeigt keine signifikante Verbesserung gegenüber der unbehandelten Kontroll-Gruppe 5.

Beispiel 8

In diesem Beispiel wurden über ein Mausmodell mit Spezifität für das Lympho-Choriomeningitisvirus (LCMV) Vaccinierungen mit dendritischen Zellen, die mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten behandelt worden waren, zur Induktion einer antiviralen Immunität getestet. Das verwendete Testverfahren ist im Prinzip aus der Druckschrift J. Virol. 1998, 72: 3812-18 bekannt.

Auf gleiche Art und Weise wie in Beispiel 7 wurden dazu dendritische Zellen mit GP-33 behandelt, einem Peptid, welches für die antigene Determinante eines Oberflächen-Antigens des LCM-Virus kodiert, und der Maus intravenös injiziert. Dies bewirkt, wie zuvor geschildert, je nach Aktivierungsgrad bzw. Vorbehandlung der dendritischen Zellen eine mehr oder minder effektive Immunisierung des Tieres gegenüber LCMV. Die Effektivität der Immunisierung wurde dann nach einer Woche durch Impfung der Maus mit dem kompletten LCMV ermittelt. Eine erfolgreiche Immunisierung gegen das Virus lässt sich in Form einer klonalen Expansion von GP-33 spezifischen T-Zellen im Blut und den lymphatischen Organen der behandelten Tiere

ablesen. In einem weiteren Assay wird die Bestimmung der Virus-Last (Anzahl der Viren) im peripheren Blut bestimmt.

In einer zweiten Ausführungsform, die im folgenden beschrieben werden wird, stellt die Erfindung einen Impfstoff zur Verfügung, der zumindest ein Antigen oder Peptid enthält und ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls modifiziert sein kann, als Immunantwortverstärker (Adjuvans). Überraschend wurde gefunden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls modifiziert sein können, vorteilhaft als Adjuvans bei der direkten Vaccinierung mit Antigenen oder Peptiden verwendet werden können.

Bei dieser Methode wird ein Impfstoff (Vaccin), der das Antigen enthält, dem Patienten subkutan (s.c.), intrakutan (i.c.) oder auch intravenös (i.v.) injiziert. Das injizierte Antigen wird von körpereigenen Antigen Präsentierenden Zellen (APZ) z.B. den dendritischen Zellen aufgenommen und in den regionalen Lymphknoten präsentiert, was eine antigenspezifische Immunantwort auslöst. Überraschend konnte gezeigt werden, daß die gleichzeitige Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, die Immunantwort durch die Rekrutierung, Aktivierung und Reifung von APZ an der Einstichstelle verstärkt.

Die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind bereits bei der ersten Ausführungsform der Erfindung ausführlich beschrieben worden. Die in dieser zweiten Ausführungsform der Erfindung einsetzbaren niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind die gleichen wie bei der ersten Ausführungsform beschrieben. Die Herstellung erfolgt ebenfalls wie vorstehend beschrieben.

Der erfindungsgemäße Impfstoff gemäß der zweiten Ausführungsform kann im Prinzip jedes Antigen oder Peptid, das eine Immunantwort hervorrufen soll, enthalten. Die Hyaluronsäurefragmente bzw. die chemischen Modifikationen davon sind bevorzugt in der gleichen Lösung enthalten, in der auch das Antigen oder Peptid enthalten ist. Es ist aber auch möglich, das Antigen oder Peptid separat von den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten bzw. deren chemischen Modifikationen zu verabreichen. Ein Impfstoff, der sowohl das Antigen bzw. Peptid als auch das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, enthält, enthält das Antigen bzw. Peptid in einer Konzentration von ca. 1 bis 1000 µg/ml, bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 100 µg/ml und das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment bzw. dessen chemische Modifikationen in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 1000 µg/ml, bevorzugt in einer Konzentration von 10 µg/ml bis 100 µg/ml, z.B. 30 µg/ml. Eine geeignete tägliche Dosierung an Antigen oder Peptid beträgt z.B. 1 bis 1000 µg/Tag, bevorzugt 10 bis 100 µg/Tag und die tägliche Dosierung an den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten bzw. deren chemischen Modifikationen kann z.B. 10 ng/Tag bis 1000 µg/Tag, bevorzugt 10 µg/Tag bis 100 µg/Tag, z.B. 30 µg/Tag, betragen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können außer dem Antigen bzw. den Peptiden und den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, noch weitere im Stand der Technik bekannte Hilfsstoffe enthalten, z.B. Freundsches Adjuvans.

Erfindungsgemäß kann die Verabreichung und Verwendung der niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen erfolgen wie es auf dem Fachgebiet üblich und dem Fachmann geläufig ist.

Das folgende Beispiel erläutert diese zweite Ausführungsform der Erfindung.

Beispiel 9

Zur Überprüfung der *in vivo* Wirksamkeit von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten wurde gesunden Probanden (N=3) 100 µl einer 1 mg/ml Präparation von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten (eine Grundeinheit und Fragmente mit 2 bis 20 Grundeinheiten) und als Kontrolle 100 µl isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl) an zwei aufeinander folgenden Tagen subkutan injiziert. Am Tag drei wurden Stanzbiopsien entnommen und die Präparate immunhistologisch aufgearbeitet. Schon nach 24 h zeigte sich klinisch nach subkutaner Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten eine leichte Entzündungsreaktion in Form einer diskreten Rötung um die Einstichstelle, sowie ein deutliches Infiltrat, welches überwiegend aus aktivierten "maturen" (ausgereiften) dendritischen Zellen besteht. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Präparate zusammengefaßt. Die in die Dermis infiltrierenden Zellen wurden unter dem Mikroskop unter 40-facher Vergrößerung mittels eines Raster-Okulars ausgezählt, pro Präparat wurden 3 x 12 Felder gezählt und daraus die Anzahl der infiltrierenden Zellen pro mm² errechnet. Tabelle 6 zeigt die deutliche Zunahme von infiltrierenden Zellen schon 24 h nach der Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, im Gegensatz dazu zeigt die parallel durchgeföhrte Kontrollinjektion keinen solchen Effekt. Die genaue Immun-Phänotypisierung des Infiltrats zeigt ein deutliches Überwiegen von CD1a sowie HLA-DR positiven Zellen an den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten behandelten Stellen, das heißt die Zellen zeigen den Phänotyp von reifen dendritischen Zellen. Eine deutliche Zunahme von Lymphozyten oder einzelnen Subklassen (CD19 = B-Zellmarker, CD3 = T-Zellmarker, CD4 = T-Helferzellmarker, CD8 = markiert zytotoxische T-Zellen) ist zumindest in dem beobachteten Zeitraum nicht festzustellen

(Tabelle 6). Im deutlichen Gegensatz zu diesem Befund zeigt das Infiltrat nach Kontroll-Injektion von isotoner Kochsalzlösung eine wesentlich homogener Verteilung, vergleichbar mit der Verteilung der einzelnen Subklassen wie sie bei einer unspezifischen Entzündungsreaktion gefunden wird (Tabelle 6).

Tabelle 6

Beobachtungszeitraum	24 h	24 h	48 h	48 h
Agens	s-HA Frag.	0,9% NaCl	s-HA Frag.	0,9% NaCl
infiltrierende Zellen / mm ²	365	123	453	235
CD1a positiv	89%	49%	78%	42%
HLA-DR positiv	75%	34%	83%	45%
CD3 positiv	23%	44%	28%	52%
CD4 positiv	15%	26%	17%	40%
CD8 positiv	6%	8%	8%	15%
CD19 positiv	2%	1%	1%	3%

Das Beispiel belegt, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente offensichtlich neben der potenteren Aktivierung von dendritischen Zellen *in vitro* gemäß der ersten Ausführungsform der Erfindung auch eine gerichtete Immigration von aktivierten dendritischen Zellen an die Injektionsstelle *in vivo* hervorrufen kann. Diese dendritischen Zellen migrieren dann nach Aufnahme von koinjizierten bzw. an niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente gekoppelte Antigenen/Peptiden zu den regionalen Lymphknoten, wo sie eine spezifische T-Zell vermittelte Immunantwort induzieren können.

Im folgenden wird die dritte Ausführungsform der Erfindung beschrieben, gemäß der Impfstoffe zur Verfügung gestellt werden, die ein System enthalten, in dem die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen an ein Antigen oder Peptid gekoppelt sind. Durch diese

Ausführungsform der Erfindung wird insbesondere das Problem gelöst, daß sich mit einer lokalen Antigeninjektion zwar Immunantworten auslösen lassen, diese jedoch weitgehend auf die injizierte Extremität oder sogar nur die nächste Lymphknotenstation beschränkt bleiben. Mit den erfindungsgemäßen Impfstoffen gemäß der dritten Ausführungsform ist es möglich, das Antigen auch systemisch z.B. intravenös zu verabreichen, ohne daß das Adjuvans (die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können) durch den Verdünnungseffekt im peripheren Blut innerhalb kurzer Zeit unwirksam wird.

Die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind die gleichen wie bereits bei der ersten Ausführungsform beschrieben und können auf die gleiche Art und Weise hergestellt werden.

Als Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, können üblicherweise in Impfstoffen, bevorzugt in Impfstoffen zur Tumorthерапie, eingesetzte Antigene oder Peptide genannt werden.

Die Art und Weise der Kopplung zwischen niedermolekularem Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann und Peptid oder Antigen, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, ist nicht besonders eingeschränkt. Bevorzugt findet die Kopplung durch chemische kovalente Bindung von Antigen oder Peptid mit dem Adjuvans (niedermolekulares Hyaluronsäurefragment oder chemische Modifikation davon) statt, oder durch den gemeinsamen Einschluß von Antigen bzw. Peptid und Adjuvans in einer Mikrosphäre, wie sie z.B. in Cancer Res. 1998, 58: 3385-90 beschrieben ist.

Besonders bevorzugt ist es, den in der Hyaluronsäuresynthese verwendeten Grundbaustein UDP- β -D-N-Acetylglucosamin an das Antigen bzw. bevorzugt an das Peptid zu koppeln. Das heißt

besonders bevorzugt ist in der dritten Ausführungsform der Erfindung das Hyaluronsäurefragment mit einer Grundeinheit. Wie vorstehend bereits erläutert, handelt es sich hierbei um ein Aminodisaccharid aus D-Gluconsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β_1 -3-glycosidischer Bindung. UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist kommerziell erhältlich.

Die Impfstoffe gemäß der dritten Ausführungsform der Erfindung können nach Verfahren und mit Zusatzstoffen hergestellt werden, wie sie im Stand der Technik prinzipiell bekannt sind. Wesentlich ist nur, daß die neuen Kombinationen aus Peptid oder Antigen, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und niedermolekularem Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, verwendet werden. Es versteht sich von selbst, daß im vorliegenden Fall die chemische Modifikation des Hyaluronsäurefragments auch so gewählt sein kann, daß sich eine geeignete chemische Kopplung an das Antigen oder Peptid vorteilhaft durchführen läßt. Geeignete chemische Modifikationen und Kopplungsverfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt, und beliebige Verfahren des Standes der Technik können verwendet werden.

Ein erfindungsgemäßer Impfstoff gemäß der dritten Ausführungsform der Erfindung enthält z.B. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bevorzugt 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Antigens oder Peptids, gegebenenfalls mit einem Trägersystem. Eine geeignete Tagesdosis an Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, ist z.B. 1 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ bis 1000 $\mu\text{g}/\text{Tag}$, bevorzugt 10 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ bis 100 $\mu\text{g}/\text{Tag}$. Ist die Kopplung zwischen Antigen oder Peptid und niedermolekularem Hyaluronsäurefragment bzw. chemischer Modifikation davon durch kovalente Bindung erfolgt, ist die Konzentration bzw. Tagesdosis des niedermolekularen Hyaluronsäurefragments bzw. von dessen chemischer Modifikation notwendigerweise gleich der entsprechenden Konzentration bzw. Tagesdosis des Antigens oder Peptids, gegebenenfalls mit einem Trägersystem. Liegt das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment,

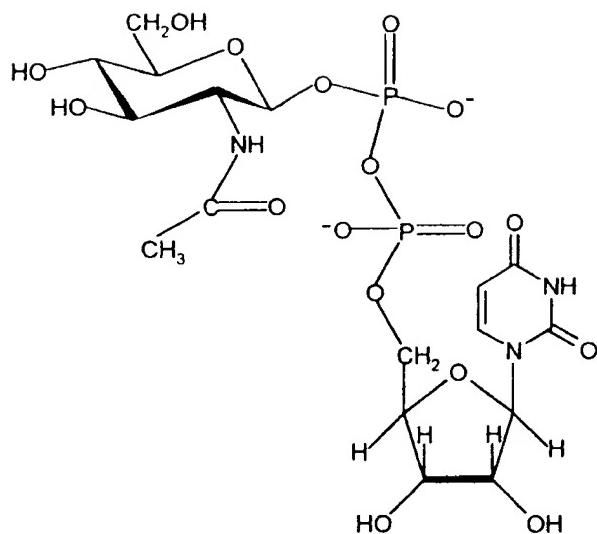
das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, und das Antigen oder Peptid nicht chemisch gebunden vor, sondern z.B. durch gemeinsamen Einschluß in einer Mikrosphäre, ist die bevorzugte Konzentration des niedermolekularen Hyaluronsäurefragments bzw. dessen chemischer Modifikation bevorzugt ebenfalls gleich der Konzentration des Antigens oder Peptids.

Mögliche Zusatzstoffe des Impfstoffes sind allgemein übliche Zusatzstoffe, z.B. Freundsches Adjuvans. Die Herstellung des Impfstoffes erfolgt auf im Stand der Technik im Prinzip bekannte Art und Weise.

Das Beispiel erläutert die dritte Ausführungsform der Erfindung.

Beispiel 8

Um eine größtmögliche Nähe von Vaccin-Peptid und Adjuvans zu erreichen, wurde das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment bzw. der in der Hyaluronsäuresynthese verwendete Grundbaustein UDP- β -D-N-Acetylglucosamin (Fragment mit einer Grundeinheit) direkt an das Peptid gekoppelt. UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist als Reinsubstanz bei Oxford Glucosciences erhältlich und zeigt eine ähnliche Wirkung auf dendritische Zellen wie die Hyaluronsäure-Spaltprodukte, was sowohl die benötigte Konzentration der Substanz wie auch den Grad der Aktivierung betrifft. Zur Kopplung wird die allgemein bekannte Umsetzung von Aldehyden und Aminogruppen zu Schiffsschen Basen genutzt. Das Zuckermolekül liegt zu einem gewissen Prozentsatz in seiner offenkettigen Aldehyd-Form vor und geht in wäßriger Lösung die oben genannte Reaktion mit dem Protein ein.

UDP- β -D-N-Acetylglucosamin

Zur Stabilisierung des Produkts wird die Verbindung durch Zugabe von Natriumborhydrit (NaBH_3) reduziert, wodurch unter Abspaltung von Wasser eine kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Aldehydgruppe und dem Stickstoffatom der Aminogruppe am Peptid entsteht.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit kann die so hergestellte Verbindung entweder intra- oder subkutan in 50-100 μl isotoner Kochsalzlösung appliziert werden. Die Peptid-HA Verbindung bindet wie zuvor beschrieben an MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Antigen Präsentierenden Zellen z.B. dendritischen Zellen und soll gleichzeitig eine Aktivierung der Zellen bewirken. Die Verabreichung kann auch intravenös erfolgen.

Bevorzugte Beispiele für Peptide gegen Tumor- und Virusantigen, die in allen erfindungsgemäßen Ausführungsformen bevorzugt sind, sind in Tabelle 7 aufgelistet:

Tabelle 7

Antigenname:	Peptidsequenz:	Targetzelle:
MELAN-1/MART-1	EAAGIGILTV	humanes Melanom
Tyrosinase	AFLPWHLRLFL	humanes Melanom
GP-33	KAVYNFATM	LCM-Virus

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe gemäß allen Ausführungsformen können das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls noch mit einem geeigneten Trägersystem, enthalten. Solche Trägersysteme sind z.B. Liposomen und Mikrosomen, die, wie im Stand der Technik bekannt ist, aus Phospholipidverbindungen hergestellt werden können.

Patentansprüche

- 1) Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, zur Herstellung eines Impfstoffes.
- 2) Verwendung nach Anspruch 1, bei der der Impfstoff zur Behandlung von Krebserkrankungen einsetzbar ist.
- 3) Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, aus 1 bis 50 Grundeinheiten bestehen.
- 4) Verwendung nach Anspruch 3, bei der das Hyaluronsäurefragment UDP- β -D-N-Acetylglucosamin (Fragment aus einer Grundeinheit) ist.
- 5) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können, zur Anreicherung von dendritischen Zellen dienen, die dann als Impfstoff eingesetzt werden.
- 6) Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:
 - a) aus Blut werden mononukleäre Zellen gewonnen,
 - b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,

WO 00/12122

- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.
- 7) Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die mononukleären Zellen aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten, insbesondere eines Ficoll-Dichtegradienten aus einem Leukozytenkonzentrat gewonnen werden.
- 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen mit Hilfe wenigstens eines gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper angereichert werden.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist.
- 10) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden, die 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen, wobei der Grundbaustein ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung ist.
- 11) Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hyaluronsäurefragmente jeweils 1 bis 10 Aminodisaccharide aufweisen.

- 12) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen zwischen 72 Stunden und 7 Tagen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF und IL-4 enthält.
- 13) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden.
- 14) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß chemisch modifizierte Hyaluronsäure-fragmente eingesetzt werden.
- 15) Angereicherte dendritische Zellen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 14.
- 16) Verwendung von angereicherten dendritischen Zellen nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Impfstoffs.
- 17) Verwendung nach Anspruch 16, bei der der Impfstoff zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt wird.
- 18) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Impfstoff niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können und ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, enthält.
- 19) Impfstoff enthaltend ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein kann.
- 20) Impfstoff nach Anspruch 19, wobei der Impfstoff für die subkutane, intrakutane oder intravenöse Verabreichung hergerichtet ist.

- 21) Impfstoff nach Anspruch 19 oder 20, wobei der Impfstoff aus einer Formulierung besteht, die das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthält.
- 22) Impfstoff nach Anspruch 19 oder 20, wobei der Impfstoff zwei getrennte Formulierungen umfaßt, wobei eine Formulierung das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, enthält und die andere Formulierung das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthält.
- 23) Impfstoff nach einem der Ansprüche 19 bis 22 zur Verwendung bei der Behandlung von Krebserkrankungen.
- 24) Impfstoff nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, aus 1 bis 50 Grundeinheiten besteht.
- 25) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Impfstoff ein System umfaßt, in dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, an ein Peptid oder Antigen gekoppelt ist.
- 26) System enthaltend ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, gekoppelt mit einem Antigen oder Peptid.
- 27) System nach Anspruch 26, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, chemisch gebunden an das Antigen oder Peptid vorliegt.

- 28) System nach Anspruch 26, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann und das Peptid oder Antigen als separate Moleküle in einer Mikrosphäre vorliegen.
- 29) System nach einem der Ansprüche 26 bis 28, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, 1 bis 50 Grundbausteine umfaßt.
- 30) System nach Anspruch 29, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist (Fragment aus einem Grundbaustein).
- 31) System nach einem der Ansprüche 26 bis 30, bei dem das Antigen oder Peptid mit einem Trägersystem vorliegt.
- 32) Impfstoff enthaltend ein System nach einem der Ansprüche 26 bis 31.
- 33) Impfstoff nach Anspruch 32 zur Behandlung von Krebserkrankungen.